

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 821 080

②1 N° d'enregistrement national : 01 02291

F3

⑤1 Int Cl<sup>7</sup> : C 07 K 16/26, A 61 K 39/395, A 61 P 35/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 20.02.01.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 23.08.02 Bulletin 02/34.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : SANOFI-SYNTHELABO Société ano-  
nyme — FR et L'ASSISTANCE PUBLIQUE HOPITAUX  
DE MARSEILLE — FR.

⑦2 Inventeur(s) : OUAFIK L HOUCINE et MARTIN  
PIERRE MARIE.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) :

⑤4 ANTICORPS SPECIFIQUE DE L'ADRENOMEDULLINE HUMAINE, COMPOSITION PHARMACEUTIQUE LE  
CONTENANT, SES APPLICATIONS THERAPEUTIQUES.

⑤7 L'invention se rapporte à un anticorps spécifique de  
l'adrénomedulline, utile dans le traitement de cancers.

L'invention se rapporte également à des compositions  
pharmaceutiques contenant un anticorps anti-adrénomé-  
dulline et à leurs applications thérapeutiques.

FR 2 821 080 - A1



L'invention se rapporte au traitement du cancer.

Le glioblastome est l'une des tumeurs du cerveau la plus courante chez l'homme, et se distingue des astrocytomes par la présence de nécroses et de proliférations vasculaires (Brain tumors, pp 433-478, Edinburgh, Churchill  
5 Livingstone, 1995). Les traitements actuellement disponibles ne sont malheureusement que d'une efficacité limitée pour ces tumeurs et le pronostic est par conséquent défavorable.

On sait que les facteurs de croissance régulent la prolifération et la  
différentiation cellulaires et sont directement impliqués dans la transformation  
10 néoplasique (Ann. Intern. Med. 117 : 408-414, 1992). L'une des caractéristiques communes de beaucoup de ces peptides (hormones, facteurs de croissance, enzymes), essentielle à leur fonction dans la communication intracellulaire, est la présence d'un groupe  $\alpha$ -amide à l'extrémité carboxyle (Trends Biochem. Sci., 16 : 112-115, 1991):

15 Un seul complexe enzymatique, la peptidylglycine  $\alpha$ -amidante monooxygénase (PAM) est responsable de l' $\alpha$ -amidation de ces peptides et hormones (Annu. Rev. Neurosci. 15 : 57-85, 1992). Une activité PAM a ainsi été trouvée dans des tumeurs endocrines sécrétant des peptides  $\alpha$ -amidés, notamment dans le carcinome thyroïdien médullaire, le phéochromocytome (Mol. Cell.  
20 Endocrinology, 79 : 53-63, 1991), les tumeurs pancréatiques sécrétant le peptide intestinal vasoactif (VIP) (Clinical Endocrinology, 33 : 467-480, 1990), et chez l'homme dans des tumeurs hypophysaires (Metabolism, 34 : 1044-1052, 1985).

L'adrénomédulline (AM) est un peptide présentant des homologies avec le peptide couplé au gène de la calcitonine (CGRP) (de l'anglais "calcitonin gene-related") et a été classée de ce fait dans la famille calcitonine / CGRP / amyline  
25 (Crit. Rev. Neurobiol., 11 : 167-239, 1997). AM est exprimée dans de nombreux tissus, notamment la médulla de la glande surrénale, les poumons, les reins, et l'atrium cardiaque (FEBS Lett, 352 : 105-108, 1994). AM a été montré induisant une réponse multiple sur cultures cellulaires et modèles animaux avec modulation de la  
30 prolifération cellulaire, de l'apoptose et induction de l'angiogenèse.

L'expression de AM a également été mise en évidence dans différentes tumeurs humaines d'origine neurale ou pulmonaire, notamment le cancer du poumon à petites cellules, l'adénocarcinome, le carcinome bronchoalvéolaire, le

carcinome de cellules squameuses, les carcinoïdes pulmonaires, le ganglioneuroblastome et le neuroblastome (Endocrinology, 136 : 4099-4105, 1995).

AM pourrait être impliquée dans la genèse des tumeurs. Deux lignées cellulaires transformées de glioblastome (T98G et A172) ont été montrées capables  
5 d'exprimer et de sécréter AM (Peptides, 18 : 1117-1124, 1997; J. Biol. Chem., 271 : 23345-23351, 1996).

Il a été également montré que AM et son récepteur (AM-R) sont exprimés de façon ubiquitaire pendant l'embryogenèse et la carcinogenèse. Trois récepteurs (L1, RDC1 et un récepteur apparenté au récepteur de la calcitonine CRLR),  
10 présentant différentes affinités pour AM, ont été clonés et séquencés (J. Biol. Chem., 270 : 24344-25347, 1995). Ils appartiennent tous à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. CRLR nécessite la présence de protéines partenaires possédant un seul domaine transmembranaire et appelées protéines modifiant l'activité de récepteur (RAMPs) (Nature (Lond.), 393 :  
15 333-339, 1998). L'association du CRLR et des protéines RAMP spécifie la nature des ligands liés à ce complexe. Associé à RAMP1, CRLR est sous forme mature, pleinement glycosylé et lie le CGRP. Associé à RAMP2 ou RAMP3, CRLR est sous forme immature partiellement glycosylé et peut lier l'AM. Dans le cas d'une association avec RAMP3, CRLR présente aussi une affinité pour l'amyline.

20 Bien qu'une surexpression de AM ait été mise en évidence dans plusieurs tumeurs (J. Clin. Endocrinol. Metabol., 80 : 1750-1752, 1995), les effets réels de AM sur la genèse des tumeurs restent inconnus.

Il existe donc toujours aujourd'hui un besoin en des traitements capables de ralentir ou de stopper le développement de tumeurs cancéreuses.

25 L'invention vise à répondre à ce besoin.

Un premier objet de l'invention est de fournir des anticorps spécifiques de AM humaine ou anticorps anti-AM.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'anticorps spécifiques de AM humaine dans le traitement de cancers.

30 Un autre objet de l'invention concerne une composition pharmaceutique destinée au traitement de cancers.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'anticorps spécifiques pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de cancers.

Selon l'invention, il a été trouvé que les anticorps anti-AM possèdent un effet inhibiteur sur la croissance de cellules tumorales *in vitro* et *in vivo*.

Selon un premier aspect, l'invention concerne un anticorps, ou un fragment de celui-ci, capable de reconnaître la protéine AM humaine.

5 L'anticorps anti-AM selon l'invention peut être monoclonal ou polyclonal. Les techniques classiques de production d'un anticorps peuvent être utilisées dans le cadre de l'invention.

Par exemple, des anticorps dirigés contre AM peuvent être obtenus en administrant le peptide AM ou un ou plusieurs fragments de AM portant des épitopes  
10 à des cellules ou des animaux, en utilisant les techniques classiques.

Le choix des animaux utilisés pour la production d'anticorps n'est pas limitatif en soi. Il peut s'agir par exemple de souris, de chèvre, de lapin.

Pour la préparation d'anticorps monoclonaux, les techniques fournissant des anticorps produits par des cultures de lignées cellulaires en continu peuvent être  
15 utilisées. Des exemples de techniques comprennent la technique des hybridomes (Kohler, G. , Milstein, C., Nature, 256 : 495-497, 1975), la technique des trioma, la technique des hybridomes de cellules B humaines (Kozbor *et al.*, Immunology Today, 4 : 72, 1983) et la technique des hybridomes EBV (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

20 On peut également préparer les anticorps monoclonaux par recombinaison génétique, à partir de banques de cellules souches humaines ou par la technique de "phage display".

Des anticorps chimériques peuvent également être préparés, en utilisant des anticorps monoclonaux humains comportant des parties variables de souris ou  
25 d'autres espèces, spécifiques de l'AM humaine.

Les techniques pour la production d'anticorps à chaîne unique (U.S. Patent No. 4,946,778) peuvent également être adaptées pour produire les anticorps de l'invention. Egalement, les souris transgéniques ou d'autres organismes incluant des mammifères différents, peuvent être utilisées.

30 Selon un autre aspect, l'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant en tant que principe actif un anticorps, ou un fragment de celui-ci, spécifique de la protéine AM.

La composition selon l'invention est en particulier destinée au traitement de cancers et/ou de cellules tumorales.

On citera à titre illustratif et non limitatif le cancer de la prostate, le cancer des ovaires, le traitement des neuroblastomes, des glioblastomes, le cancer du poumon, l'adénocarcinome, le carcinome bronchoalvéolaire, le carcinome de cellules squameuses, les carcinoïdes pulmonaires, le ganglioneuroblastome.

5 La composition selon l'invention est de préférence administrée par voie injectable, notamment par voie intra-veineuse, sous-cutanée, ou par administration dans le réseau lymphatique.

La quantité de principe actif à administrer dépend du degré d'avancement de la pathologie à traiter, ainsi que de l'âge et du poids du patient. Néanmoins, les  
10 doses unitaires comprennent généralement de 1 µg à 1 g, avantageusement de 10 mg à 100 mg de principe actif. Ces doses unitaires sont administrées normalement en une ou plusieurs fois par jour, de préférence de une à trois fois par jour.

Selon un autre aspect, l'invention concerne un anticorps, ou un fragment de celui-ci, capable de reconnaître la protéine AM humaine, pour utilisation en tant que  
15 principe actif d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de cancers et/ou de cellules tumorales.

Plus particulièrement, l'anticorps selon l'invention est destiné au traitement du cancer de la prostate, du cancer des ovaires, des neuroblastomes, des glioblastomes, le cancer du poumon, l'adénocarcinome, le carcinome  
20 bronchoalvéolaire, le carcinome de cellules squameuses, les carcinoïdes pulmonaires, le ganglioneuroblastome.

Selon encore un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation d'un anticorps, ou d'un fragment de celui-ci, spécifique de la protéine AM pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de cancers  
25 et/ou de cellules tumorales.

Selon l'invention, cette utilisation est destinée au traitement du cancer de la prostate, du cancer des ovaires, des neuroblastomes, des glioblastomes, le cancer du poumon, l'adénocarcinome, le carcinome bronchoalvéolaire, le carcinome de cellules squameuses, les carcinoïdes pulmonaires, le ganglioneuroblastome.

30 Des caractéristiques et avantages supplémentaires de l'invention apparaîtront dans la description détaillée qui suit, faite en relation avec les figures dans lesquelles :

La figure 1 représente l'analyse densitométrique de l'expression de l'ARNm de PAM dans le gliome humain, les lignées cellulaires glioblastomales et les tissus

de cerveau non tumoral. L'ARN total (20 µg) est séparé par électrophorèse sur gel dénaturant agarose (1 %) - formaldéhyde et transféré sur une membrane Hybond-N et hybridés avec une sonde d'ADNc humain de PAM de 2,2 kb. Les membranes sont ensuite exposées en autoradiographie pendant 24 h. En contrôle, après  
5 décrochage, les membranes sont réhybridées avec une sonde d'ADNc produite à partir d'ARN ribosomal 18S de grenouille. Sur la figure 1 A et B, la quantité d'ARNm de PAM est normalisée à la quantité d'ARN ribosomal 18S. Les résultats correspondent à la moyenne de quatre expériences indépendantes.

NB : cerveau normal; GGIV : gliome de degré IV; GGII : gliome de degré II.

10 La figure 2 représente une mesure de l'expression de l'ARNm de AM dans des lignées glioblastomales et dans le cerveau normal. L'ARN total (15 µg) préparé à partir de lignées cellulaires de glioblastomes et de cerveau est analysé par Northern Blot. Les membranes sont hybridées avec une sonde d'ADNc de AM humain, puis après décrochage, réhybridées avec un contrôle ADNc 18S ribosomal  
15 pour la normalisation. Sur la figure 2, la quantité d'ARNm de AM indiquée est normalisée à la quantité d'ARN ribosomal 18S. Les résultats correspondent à la moyenne de quatre expériences indépendantes.

La figure 3 représente l'analyse par RT-PCR de l'expression de l'ARNm de AM dans les gliomes. Les ARN totaux extraits d'oligodendrogliome et de  
20 glioblastome sont rétrotranscrits en ADNc puis analysés par RT-PCR quantitative. Les résultats sont exprimés par rapport à l'expression d'un contrôle interne, la GAPDH (glyceraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase).

La figure 4 représente l'inhibition de la reconnaissance de AM radiomarcqué avec  $I^{125}$  par l'anticorps anti-AM. Des cellules glioblastomales (U87) sont incubées  
25 pendant 120 min à 25°C en présence de  $I^{125}$ -AM (60 µci µg<sup>-1</sup>; 7 x 10<sup>4</sup> cpm par test) et des concentrations croissantes de l'anticorps. Chaque point est le résultat de trois expériences.

La figure 5 représente les effets de AM et de l'anticorps anti-AM sur la prolifération des cellules U87 (Fig. 5A) et U373 (Fig. 5B) *in vitro*. Les cellules  
30 tumorales sontensemencées à une densité de 6 x 10<sup>3</sup> cellules par puits dans des plaques 12 puits en présence de milieu MEM additionné de 2 % de FBS, 2 mM de glutamine et d'antibiotiques. On ajoute AM à une concentration de 2 x 10<sup>-7</sup> M et l'anticorps anti-AM "AMAb2" (12 µg /ml) en présence ou non de AM (10 µM). Sur la figure 5, C représente les cellules non traitées. Les contrôles sont constitués de

"AMAb2" dénaturé par la chaleur et de IgG (Ed.1) non relevant. Pour chaque traitement, six points sont employés pour la mesure MTT et six points sont employés pour le comptage des cellules dans un compteur Coulter. Les barres verticales représentent SEM.

5        \*\* :  $p < 0,007$  ; \*\*\* :  $p < 0,0001$ .

La figure 6 représente le traitement avec l'anticorps anti-adrénomédulline de xenografts de tumeurs humaines établies. Des souris porteuses de tumeurs U87, de taille approximative de  $1350 \pm 100 \text{ mm}^3$ , reçoivent deux fois par semaine un traitement intra tumoral de  $200 \mu\text{g}$  de AMAb2 ( $n=20$ ) ou un contrôle d'IgG non relevant ( $n=7$ ). Les souris non traitées avec AMAb2 sont sacrifiées entre 21 et 24 jours, en raison de la grosseur des tumeurs. Le volume moyen des tumeurs pendant une période de plus de 70 jours est montré sur la figure 6. Les grosseurs des tumeurs dans le groupe traité au PBS ne sont pas différentes de celles obtenues dans le groupe traité avec l'IgG contrôle non relevant.

#### 15        Culture cellulaire et tests de prolifération cellulaire.

Les lignées cellulaires de glioblastome humain sont obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) et sont cultivées en milieu essentiel minimal (MEM) (U373, U138, U87) ou dans du milieu L15 (SW1783 et SW1088), disponibles auprès de la société Life Technologies, Paris, France, en présence de pénicilline ( $50 \text{ U / ml}$ ), de streptomycine ( $50 \mu\text{g / ml}$ ), de glutamine ( $1 \text{ mg / ml}$ ) et de sérum de veau fœtal (10 %). Les cellules sont cultivées dans une atmosphère humide 95% air / 5 %  $\text{CO}_2$ . Le milieu de culture est changé tous les deux jours. L'activité d'amidation et les ARNs sont préparés lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance. Les effets de CGRP<sub>8-37</sub>, AM<sub>22-52</sub>, AM<sub>1-52</sub> et de l'anticorps de lapin anti-AM sur la prolifération cellulaire sont examinés aux temps indiqués par le test MTT bromure de 3-(4,5-diméthyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (Cancer Res. 49: 4435-4440, 1989) (Cancer Res. 47 : 943-946, 1987). Les résultats sont exprimés en pourcentages des rapports T/C, où T est la densité optique ( $\text{OD}_{570}$ ) des cultures traitées (milieu MEM et CGRP<sub>8-37</sub>, AM<sub>22-52</sub>, AM<sub>1-52</sub> ou anticorps de lapin anti-AM) et C est la densité optique ( $\text{OD}_{570}$ ) des cultures non traitées (milieu MEM seul).

#### 30        Patients et préparation des tissus.

Des tissus tumoraux de patients opérés pour des gliomes sont étudiés. 5 gliomes de degré II (degré faible), 7 oligodendrogliomes anaplasiques et 13

glioblastomes (degré IV) (selon la classification histopathologique WHO) sont utilisés. Les échantillons de tumeurs sont recueillis au moment de l'intervention chirurgicale et conservés immédiatement dans l'azote liquide jusqu'à extraction des ARNs. Un tissu télencéphalique normal est prélevé sur un patient opéré dans le cadre d'un traitement contre l'épilepsie. Tous les protocoles de prélèvement de  
5 tissus ont été réalisés selon les exigences des comités institutionnels et avec l'accord des patients.

#### Analyse par Northern Blot.

L'extraction des ARNs totaux est réalisée à partir des gliomes humains, du  
10 tissu télencéphalique normal et des lignées cellulaires en utilisant la méthode à l'isothiocyanate de guanidinium / phénol / chloroforme (Anal. Biochem., 162 : 156-159, 1987) avant analyse par Northern Blot.

#### Préparation des extraits de tissus et test d'amidation.

Les cellules sont décollées et recueillies en tampon PBS froid, et préparées  
15 pour un test d'amidation.

#### Extraction des peptides et radioimmunoessai.

Pour mesurer l'immunomarquage anti-AM (IR-AM), les cellules sont préparées selon la procédure décrite dans FEBS Lett., 352 : 105-108, 1994. La caractérisation chromatographique de IR-AM dans le milieu de culture est réalisée  
20 par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse, en utilisant une colonne  $\mu$ Bondapak C18 (3,9 x 300 mm; Waters). Le milieu conditionné (15 ml) est extrait en utilisant des cartouches Sep-Pak C18. L'extrait est reconstitué avec une solution contenant 0,1 % (vol / vol) d'acide trifluoroacétique et chargé sur la colonne. L'analyse est réalisée avec un gradient linéaire d'acétonitrile contenant 0,1  
25 % (vol / vol) d'acide trifluoroacétique, de 10 à 60 % à une vitesse de 1 ml / min / fraction pendant 50 min. Chaque fraction (1 ml) est recueillie, séchée et analysée.

#### RT-PCR quantitative.

Une méthode de RT-PCR (réaction de polymérase en chaîne) quantitative en temps réel est utilisée pour mesurer les variations du nombre de copies de AM  
30 ou GAPDH. L'ARN total (2  $\mu$ g) libre d'ADN est transcrit en ADN complémentaire (ADNc) en présence d'un  $\mu$ g d'hexamères (Pharmacia Biotech, Orsay, France) et de la transcriptase inverse MMLV (de l'anglais "Moloney leukemia virus"), tel que décrit par Life Technologies Inc., Paris, France. De l'ARNm d'AM et de GAPDH humaine est amplifié (AM : amorce sens 5'-TGCCCAGACCCTTATTCGG-3' et



amorce antisens 5'-AGTTGTTTCATGCTCTGGCGG-3'; GAPDH : amorce sens 5'-CAAATTCATGGCACCCTC-3' et amorce antisens 5'-CCCATCTGATTTTGGAGGGA-3'), et quantifié en temps réel en utilisant le système de détection ABI Prism 7700 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA).

5 Les sondes Taq Man pour AM et GAPDH sont 5'-ACATGAAGGGTGCCTCTCGAAGCCC-3' et 5'-CCCATCACCATCTTCCAGGAGCGAG-3' respectivement. Le mélange d'amplification contient l'ADNc produit à partir de 50-150 ng de l'ARN total, 0,2 µM d'amorce, et 0,1 µM de sonde Taq Man dans 50 mM de NaCl et 5 mM de Mg<sup>2+</sup>. Une  
10 PCR en deux étapes est réalisée à 35 cycles. La dénaturation est faite à 94°C pendant 20 sec, et la fixation des amorces sur la matrice / extension à 60°C pendant 30 sec. La réaction produit un produit PCR de 115 paires de base (bp) pour AM et de 101 bp pour GAPDH. Pour quantifier les résultats, des niveaux d'ARNm de AM sont normalisés aux niveaux d'ARNm de GAPDH dans la même  
15 réaction. Pour créer des courbes standard pour chaque gène, les ARNs sont produits par transcription *in vitro* à partir des matrices ADNc linéarisés de AM et de GAPDH par les polymérases T7 ou T3 puis rétrotranscrits en ADNc. En utilisant des sondes AM et GAPDH marquées par des fluorochromes dans les conditions expérimentales définies ci-dessus, une relation linéaire entre la concentration en  
20 ARN rétrotranscrit en ADNc et le signal de fluorescence ( $\Delta RQ$ ) des ARNs de AM et GAPDH dans 1-250 pg d'ADN cible est obtenue. Pour chaque échantillon inconnu, les valeurs  $\Delta RQ$  sont déterminées pour les deux gènes, et les résultats sont exprimés en fg de AM par pg de GAPDH.

#### Analyse par RT-PCR des ARNm de CRLR et RAMP.

25 Des amorces telles que définies dans le tableau 1 figurant en annexe de la présente demande de brevet sont sélectionnées pour être spécifiques de CRLR, RAMP2 et RAMP3. Les réactions de PCR initiées par les jeux d'amorces spécifiques pour CRLR, RAMP2 et RAMP3 sont réalisées avec de l'ADNc produit à partir de lignées cellulaires de gliome et d'échantillon prélevé sur un gliome humain.  
30 Les paramètres de cycles sont les suivants :

Etape de dénaturation initiale : 94°C, 5 min,

35 cycles : fixation des amorces sur la matrice : 40 sec. puis extension / polymérisation à 68°C, 50 sec., puis dénaturation 94°C, 30 sec., la dernière extension étant prolongée de 10 min. Les températures de fixation des amorces sur

la matrice dépendent du couple d'amorces utilisé et sont indiquées dans le tableau 1. Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % dans un tampon Tris / borate contenant 0,5 µg / ml de bromure d'éthidium; les gels sont rincés en tampon NaCl 1,5 M, NaOH-0,5 N pendant 15 min et ensuite pendant 30 min dans Tris-HCl 1 M, pH 8,0, NaCl 1,5 M avant transfert sur une membrane Hybond-N. Les filtres sont mis à hybrider avec les sondes indiquées dans le tableau 1, lavés et mis en autoradiographie.

#### Production des anticorps anti-AM.

Des lapins néo-zélandais femelles sont immunisés trois fois en sous-cutané avec de l'AM humaine (Bachem) (120 µg AM équivalent par injection : la première dose dans un adjuvant de Freund complet, les deux dernières dans un adjuvant de Freund incomplet). Les sérums sont sélectionnés pour leur activité anti-AM, puis purifiés par affinité sur colonne de protéine A Sépharose (Amersham Pharmacia Biotech).

#### Reconnaissance de AM marqué à I<sup>125</sup>.

Des cellules de glioblastome sont cultivées dans des plaques 24 puits jusqu'à confluence (1 x 10<sup>5</sup> cellules / puit) et déprivées en sérum pendant 24 h après lavage avec un tampon PBS sans Ca<sup>2+</sup> additionné de 0,2 % de sérum albumine bovine (BSA) et de Bacitracine (100 mg / ml, Sigma), les cellules sont incubées à 25°C pendant 120 min avec le marqueur radioactif (I<sup>125</sup>) en présence ou en absence d'un excès (10<sup>-8</sup> M) de AM non radiomarkée. Le marquage à l'iode de AM humaine (Amh) synthétique est réalisée par la méthode à la chloranine T et le produit est purifié par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse. De l'Amh monoiodée (I<sup>125</sup>) (SA, 350 Ci / mmol) est utilisée dans les expériences. Dans les études d'inhibition de reconnaissance (de l'anglais "binding"), les cellules sont incubées avec le marqueur radiomarké et des concentrations croissantes d'anticorps anti-AM. A la fin de la période d'incubation, les cellules sont lavées avec du PBS froid contenant 0,2 % de BSA, solubilisées avec de l'hydroxyde de sodium 0,2 M, et la radioactivité retenue est mesurée par un spectromètre-γ. La fixation spécifique est obtenue par soustraction de la mesure de la reconnaissance non spécifique obtenue en présence d'AMh non marquée en excès de la mesure de la reconnaissance totale. Les données représentent la moyenne de trois expériences, chacune réalisée trois fois.

#### Animaux.

Des souris NMRI mâles (Nu / Nu) athymiques de 4 à 5 semaines (Janvier, Laval Le Genest, France), sont placées dans des cages stériles sous flux laminaire fermé, en température contrôlée et avec des périodes de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité, et alimentées et désaltérées *ad libitum*.

5     Thérapie anti-tumorale *in vivo*.

Des cellules U87 ( $3 \times 10^6$  cellules / souris) en phase exponentielle de croissance sont injectées en sous-cutané dans les flancs des souris athymiques. Après deux semaines, les tumeurs ont grossi jusqu'à un volume d'environ  $1350 \pm 170 \text{ mm}^3$ . Le traitement est initié après 14 jours. L'anticorps anti-AM AMAb2 (200  
10     $\mu\text{g}$  d'IgG purifié) est injecté dans la tumeur (20 souris) dans un volume de 0,2 ml, deux fois par semaine. Un contrôle négatif, un anti-IgG de lapin dirigé contre le peptide dérivé du précurseur de l'endothéline de rat ou le tampon phosphate (PBS) seul sont utilisés. Chaque groupe contrôle comporte sept souris. Chaque souris dans les groupes traités par immunoglobuline reçoit un total de 400  $\mu\text{g}$   
15    d'immunoglobuline par semaine pendant la durée du traitement. Les tumeurs sont mesurées deux fois par semaine pendant le traitement. Le volume des tumeurs est calculé selon la formule volume = longueur x largeur x hauteur x 0,5236 (pour une forme elliptique).

Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. Les analyses  
20    statistiques sont réalisées en utilisant la méthode ANOVA suivie par le test de différence significative de Fisher (Statview 512, Brain Power Inc., Calabasas, CA, USA). Une valeur de  $p < 0,05$  est considérée comme significative.

Expression d'ARNm de PAM dans les cellules gliomales humaines.

L'ARN total de gliome humain, de lignées cellulaires de gliome humain et de  
25    tissu de cerveau normal est préparé pour analyser le niveau d'expression de PAM. Avec une sonde de 2,2 kilobases (kb), le transcript correspondant à la PAM est mis en évidence par Northern Blot à 4 kb. Un fort niveau d'expression est mis en évidence dans le gliome humain (Fig. 1A) et les lignées cellulaires (Fig. 1B) en comparaison des tissus normaux. Après décrochage des membranes, un second  
30    marquage est réalisé avec la sonde ADNc préparée à partir d'ARNr 18S. Dans les gliomes, le niveau d'expression de PAM, quantifié et normalisé par rapport à l'ARN ribosomal 18S, apparaît être corrélé à l'agressivité de la tumeur. Les niveaux d'ARNm PAM sont 9 à 15 fois plus élevés dans les glioblastomes malins et 4 à 6 fois plus élevés dans les gliomes de faible degré que dans les tissus de cerveau

normal. La majorité des lignées cellulaires dérivées de glioblastomes humains expriment de façon constante de hauts niveaux d'ARNm de PAM (Fig. 1B).

#### Activité PAM dans les lignées de cellules.

L'activité d'amidation des extraits de chaque lignée cellulaire est testée en utilisant un substrat  $\alpha$ -N-acetyl-Tyr-Val-Gly à pH 5,5. Les lignées cellulaires U373 et SW1783 gliome de haut degré présentent des niveaux d'activité PAM plus élevés (77 +/- 4 pmol / mg de protéine / h) que les lignées U87, U138 et SW1088 (55 +/- 4,3 pmol / mg de protéine / h). L'expression de PAM à la fois dans les tumeurs et les lignées gliomales démontre leur capacité à produire des peptides  $\alpha$ -amidés.

#### Expression de l'ARNm de AM dans les lignées cellulaires.

L'expression de différents peptides  $\alpha$ -amidés connus pour avoir des propriétés mitogènes sur les cellules tumorales est analysée par RT-PCR dans différentes lignées de gliomes. Parmi tous les peptides analysés, AM présente un niveau d'expression très élevé. Le niveau d'expression de l'ARNm AM est analysé par Northern Blot sur des lignées gliomales et des tissus normaux humains (Biochem. Biophys. Res. Commun., 194 : 720-725, 1993). La taille du transcript est d'environ 1,6 kb. La quantité d'ARNm de AM est ensuite normalisée par rapport à la quantité d'ARN ribosomal 18S (Fig. 2). Toutes les lignées cellulaires gliomales testées expriment l'ARNm de AM, tandis qu'aucune expression n'est détectée dans les tissus non tumoraux.

#### Production et sécrétion de AM dans les lignées cellulaires.

L'immunomarquage anti-AM est positif dans les extraits cellulaires et le milieu de culture. Toutes les lignées gliomales produisent donc et sécrètent de l'AM. La quantité d'AM obtenue est indiquée dans le tableau 2 figurant en annexe de la présente demande de brevet.

#### Expression de l'ARNm de AM dans le gliome humain.

De l'ARN total est préparé à partir de prélèvements de tumeurs de 25 gliomes comprenant 13 gliomes de haut degré (IV), 5 gliomes de bas degré (II) et 7 oligodendrogliomes anaplasiques. Les niveaux d'expression de l'ARNm de AM sont indiqués sur la figure 3. La quantification des transcripts d'ARNm de AM révèle un plus fort niveau d'expression de l'ARNm de AM dans les glioblastomes, comparés aux oligodendrogliomes de bas degré ou anaplasiques.

#### Expression des ARNm de RAMP et CRLR dans les lignées cellulaires.

Pour déterminer si les gliomes humains et les lignées cellulaires expriment CRLR, RAMP2 et RAMP3, une analyse par Southern Blot des produits de RT-PCR est réalisée. L'analyse des produits avec les sondes correspondantes révèle des bandes aux tailles attendues (tableau 1) correspondant à l'ARNm codant pour CRLR ainsi que RAMP2 et RAMP3. Aucune bande n'apparaît dans les contrôles sans transcriptase inverse.

#### Caractérisation de l'anticorps anti-AM.

L'anticorps anti-AM polyclonal (sérum ou IgG purifié) reconnaît bien AM pleine taille mais ne montre aucune réactivité croisée avec des peptides apparentés à AM, tel que cela apparaît sur le tableau 3 figurant en annexe de la présente demande de brevet. La calcitonine, CGRP<sub>1-37</sub>, CGRP<sub>8-37</sub> et l'amyline ne montrent qu'une fixation non significative avec l'anticorps. De plus, aucune réaction croisée avec les peptides ACTH (humaine 1-24), endotheline-1 (humaine), AVP (humaine), CRF (humaine), TRH, substance P, ANF (humaine) n'est observée.

La capacité de l'anticorps à bloquer la fixation de AM-I<sup>125</sup> sur son récepteur dans des cellules U87 est testée (Fig. 4). L'anticorps bloque l'interaction récepteur – AM de façon dose dépendante.

#### Effets de AM et de l'anticorps anti-AM sur la prolifération des cellules U87 et U373 *in vitro*.

Des cellules U87 et U373 sont cultivées en présence de AM  $2 \times 10^{-7}$  M, et les effets du peptide sur la prolifération cellulaire sont examinés par une méthode MTT. Les figures 5A et 5B montrent que AM, à une concentration de  $2 \times 10^{-7}$  M, stimule la prolifération de cellules U87 de 15 % ( $p < 0,02$ ) et U373 de 20 % ( $p < 0,001$ ) après 8 jours de traitement.

Un anticorps anti-AM polyclonal (purifié IgG) est testé pour son effet inhibiteur sur la prolifération des cellules U87 et U373 cultivées en présence d'anticorps. Après 7 jours de traitement, l'anticorps à une concentration de 12 µg / ml inhibe la prolifération de U87 et U373 de 33 % ( $p < 0,002$ ) et de 50 % ( $p < 0,001$ ) respectivement (Fig. 5A et 5B).

#### Effets de l'anticorps anti-AM *in vivo* sur des souris présentant des tumeurs.

La capacité de l'anticorps anti-AM à inhiber la croissance *in vivo* a été testée sur des cellules U87 xénogreffées sur souris. Six jours après inoculation dans les souris, la lignée cellulaire produit une masse tumorale palpable ( $506 \pm 70$  mm<sup>3</sup>). Au 14<sup>ème</sup> jour ( $1\,350 \pm 170$  mm<sup>3</sup>), les tumeurs sont soumises à trois traitements :

tampon de PBS,  
IgG de spécificité non relevante,  
anticorps anti-AM (IgG purifié).

La figure 6 montre les courbes de croissance de tumeurs de souris  
5 porteuses d'un glioblastome humain U87, qui sont traités tous les trois jours avec  
l'anticorps anti-AM, ou le contrôle IgG non relevant. Le traitement est administré par  
injection intra-tumorale et la croissance est déterminée en fonction du volume  
tumoral au cours du temps. Après 21 jours de traitement avec l'anticorps à une  
dose de 200 µg deux fois par semaine, le volume moyen de la tumeur est réduit à  
10 646 +/- 166 mm<sup>3</sup> ( $p < 0,001$ ) par comparaison avec le groupe de contrôle qui atteint  
un volume de tumeur de 2 150 +/- 160 mm<sup>3</sup>. Des injections de l'anticorps pendant 7  
semaines conduisent à une très forte diminution de la croissance tumorale, une  
régression de la tumeur (masse tumorale inférieure à 40 mm<sup>3</sup> chez toutes les  
souris) ainsi qu'une augmentation significative du nombre de survivants. Le volume  
15 tumoral moyen à la fin de l'expérience représente 2 % du volume tumoral moyen  
initial. La croissance des tumeurs chez les souris des groupes de contrôle a conduit  
au sacrifice des animaux moins de 6 semaines après l'injection des cellules. Les  
poids moyens des tumeurs dans les contrôles et les souris traitées avec l'anticorps  
étaient de 3,8 +/- 0,5 g et 1,18 +/- 0,3 g respectivement ( $p < 0,001$ ) après 20 jours  
20 de traitement. La diminution du poids des tumeurs est de 68,9 % et 91,5 % après  
24 et 42 jours de traitement respectivement chez les animaux traités avec  
l'anticorps, en comparaison avec les groupes de contrôle.

## ANNEXE

TABLEAU 1

Amorces utilisées pour la détection de l'expression de CRLR, RAMP2 et RAMP3.

Cible	Espèce	Séquence	Taille	T de fixation des amorces	Référence
CRLR	Humain	Sens (850-873) 5'-GTAATGTTAACACCCACGAGAAAG-3'	405 bp	50°C	U17473
		Antisens (1232-1254) 5'-ATCCCCAGCCCAAGAAAAATAATAC-3'			
		Sonde (1095-1117) 5'-TGGGACACITTTGCCAACTAACAG-3'			
RAMP2	Humain	Sens (1-20) 5'-GGATATAGGCGCCCCCACAC-3'	402 bp	58°C	AJ001015
		Antisens (380-402) 5'-GGAAGCCCGAGTCAACAACACTCT-3'			
		Sonde (233-256) 5'-GGGGACGGTGAAGAACTATGAGAC-3'			
RAMP3	humain	Sens (447-466) 5'-CGCAGCAAACGCCACCGACAC-3'	465 bp	58°C	AJ001016
		Antisens (888-911) 5'-GAGCCAGGCGAGGAACCCAGAGATG-3'			
		Sonde (691-712) 5'-TCTAGGGCCAGTGGAGGAAAAAT-3'			

## ANNEXE

TABEAU 2

Quantité de AM dans les extraits cellulaires et le milieu de culture des lignées cellulaires gliomales.

	Quantité dans les cellules (fmol / mg de protéine)	Quantité dans le milieu de culture (fmol / ml / h)
U87	2,312 +/- 0,256	0,415 +/- 0,014
U138	2,564 +/- 0,288	0,148 +/- 0,044
SW1088	5,398 +/- 0,127	0,488 +/- 0,011
U373	2,583 +/- 0,250	0,231 +/- 0,012
SW1783	9,892 +/- 0,101	0,104 +/- 0,013



## ANNEXE

TABLEAU 3

Réactivité de l'anticorps anti-AM avec des peptides apparentés.

Peptide	% de réactivité
AM (humain, 1-52)	100
AM (humain, 22-52)	10
AM (humain, 26-52)	9
AM (humain, 13-37)	1
CGRP (humain, 1-37)	< 0,1
CGRP (humain, 8-37)	< 0,1
Amyline	0

## REVENDEICATIONS

1. Anticorps, ou un fragment de celui-ci, capable de reconnaître la protéine AM humaine.  
5
2. Anticorps selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est monoclonal ou polyclonal.
3. Anticorps polyclonal selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est  
10 préparé en utilisant des animaux, par exemple des souris, des chèvres, des lapins.
4. Anticorps monoclonal selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est  
15 préparé par recombinaison génétique, à partir de banques de cellules souches humaines ou par la technique de "phage display".
5. Anticorps selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est chimérique et  
préparé en utilisant des anticorps monoclonaux humains comportant des  
parties variables de souris ou d'autres espèces spécifiques de l'AM humaine.  
20
6. Composition pharmaceutique comprenant en tant que principe actif un  
anticorps, ou un fragment de celui-ci, spécifique de la protéine AM humaine.
7. Composition selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'elle comprend un  
25 anticorps anti-AM selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.
8. Composition selon la revendication 6 ou 7, caractérisée en ce qu'elle  
administrée par voie injectable, notamment par voie intra-veineuse, sous-  
cutanée, ou par administration dans le réseau lymphatique.
- 30
9. Composition selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée  
en ce qu'elle comprend de 1 µg à 1g, avantageusement de 10 mg à 100 mg  
de principe actif.

10. Composition selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, destinée au traitement de cancers et/ou de cellules tumorales.
- 5 11. Composition selon l'une quelconque des revendications 6 à 10, destinée au traitement du cancer de la prostate, du cancer des ovaires, des neuroblastomes, des glioblastomes, le cancer du poumon, l'adénocarcinome, le carcinome bronchoalvéolaire, le carcinome de cellules squameuses, les carcinoïdes pulmonaires, le ganglioneuroblastome.
- 10 12. Anticorps, ou un fragment de celui-ci, capable de reconnaître la protéine AM humaine, pour utilisation en tant que principe actif d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de cancers et/ou de cellules tumorales.
- 15 13. Anticorps selon la revendication 12, pour le traitement du cancer de la prostate, du cancer des ovaires, des neuroblastomes, des glioblastomes, le cancer du poumon, l'adénocarcinome, le carcinome bronchoalvéolaire, le carcinome de cellules squameuses, les carcinoïdes pulmonaires, le ganglioneuroblastome.
- 20 14. Utilisation d'un anticorps, ou d'un fragment de celui-ci, spécifique de la protéine AM humaine pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de cancers et/ou de cellules tumorales.
- 25 15. Utilisation selon la revendication 14, pour le traitement du cancer de la prostate, du cancer des ovaires, des neuroblastomes, des glioblastomes, le cancer du poumon, l'adénocarcinome, le carcinome bronchoalvéolaire, le carcinome de cellules squameuses, les carcinoïdes pulmonaires, le ganglioneuroblastome.

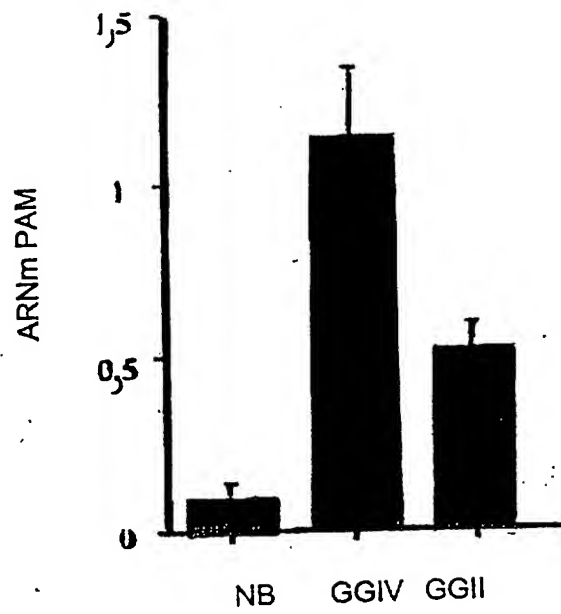


Fig. 1A

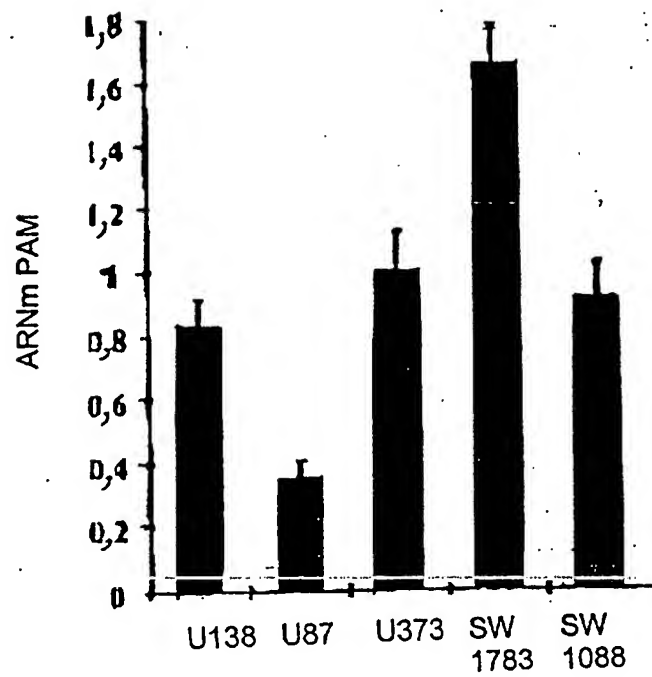


Fig. 1B

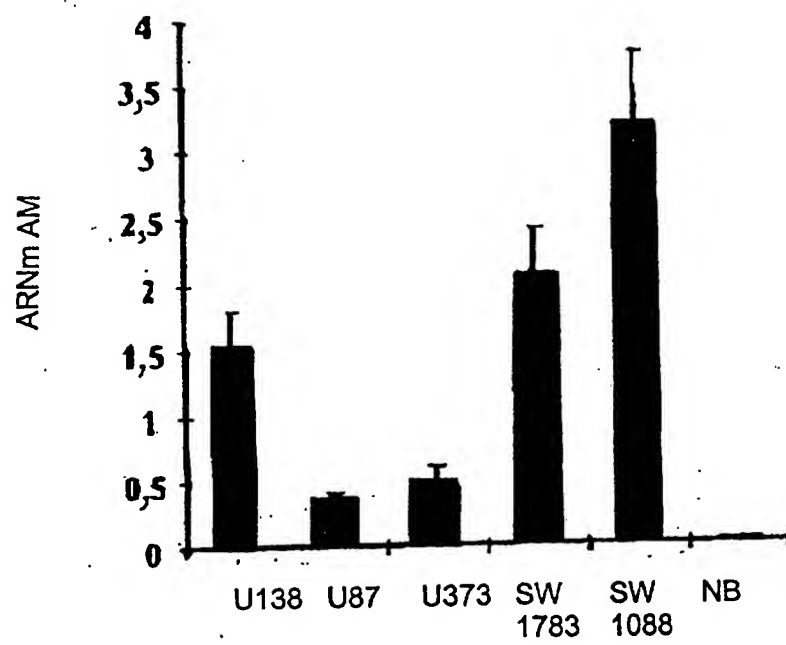


Fig. 2

Fig. 3

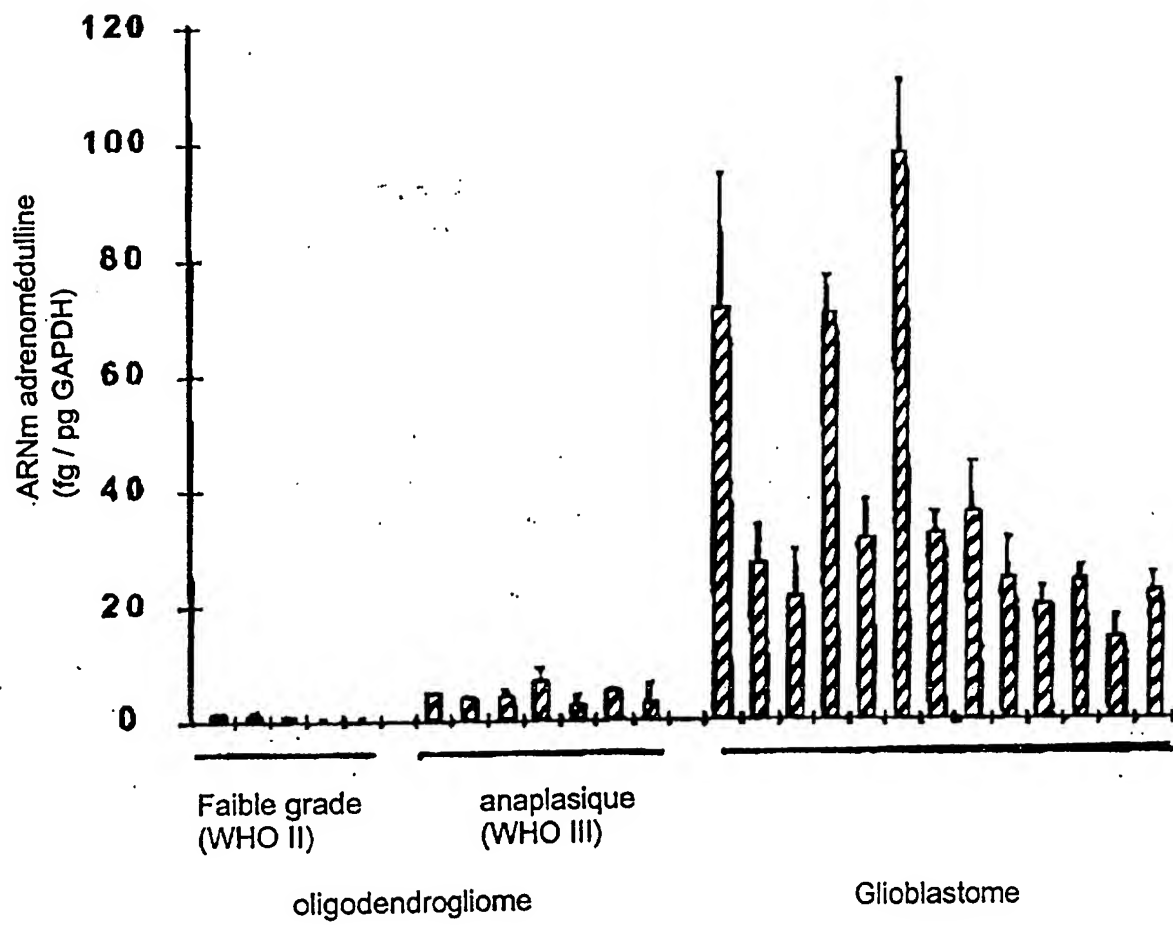


Fig. 4

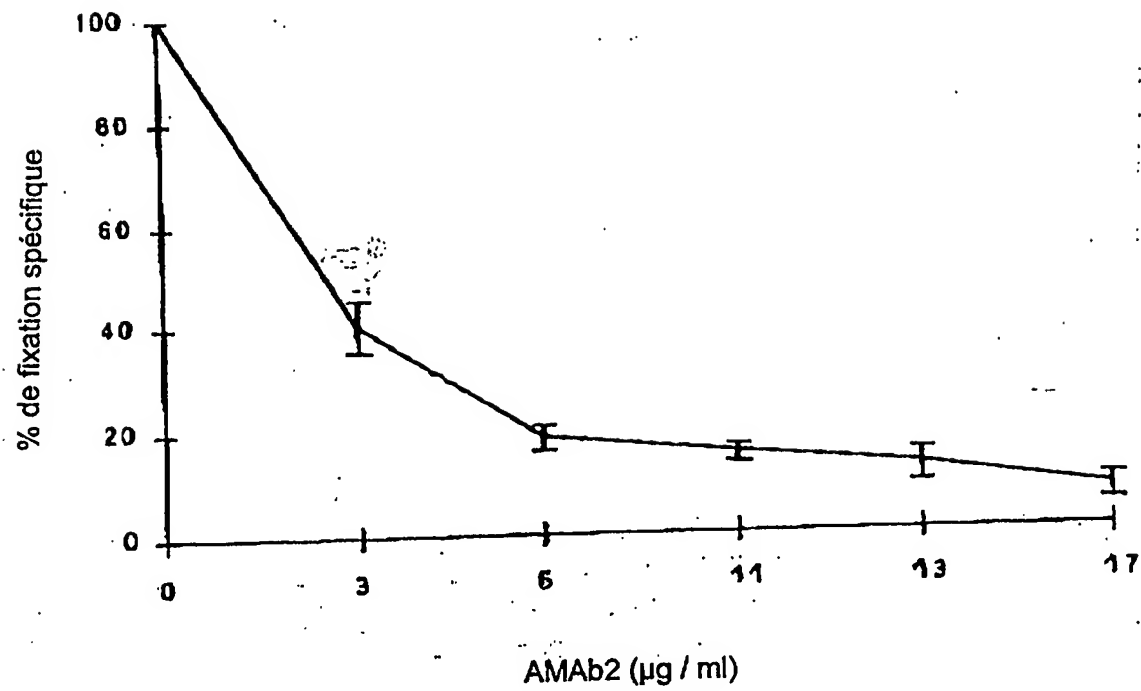


Fig. 5A

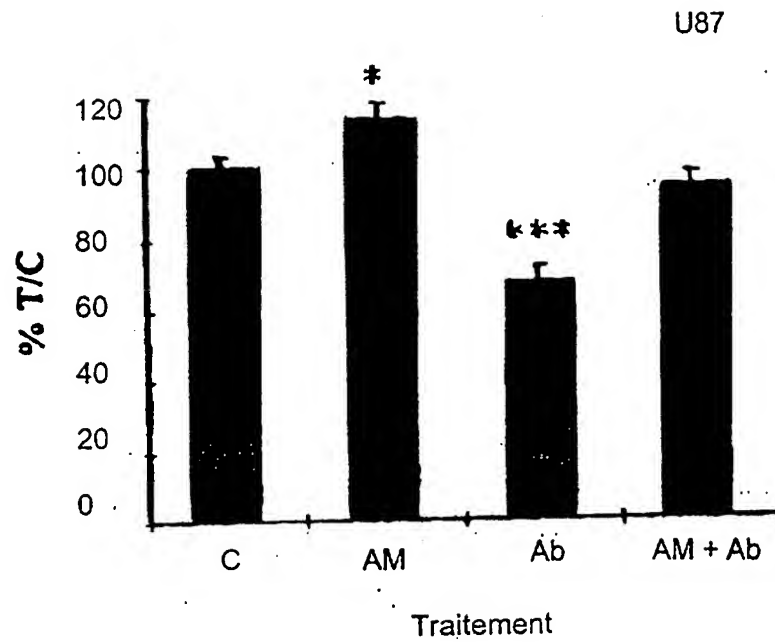
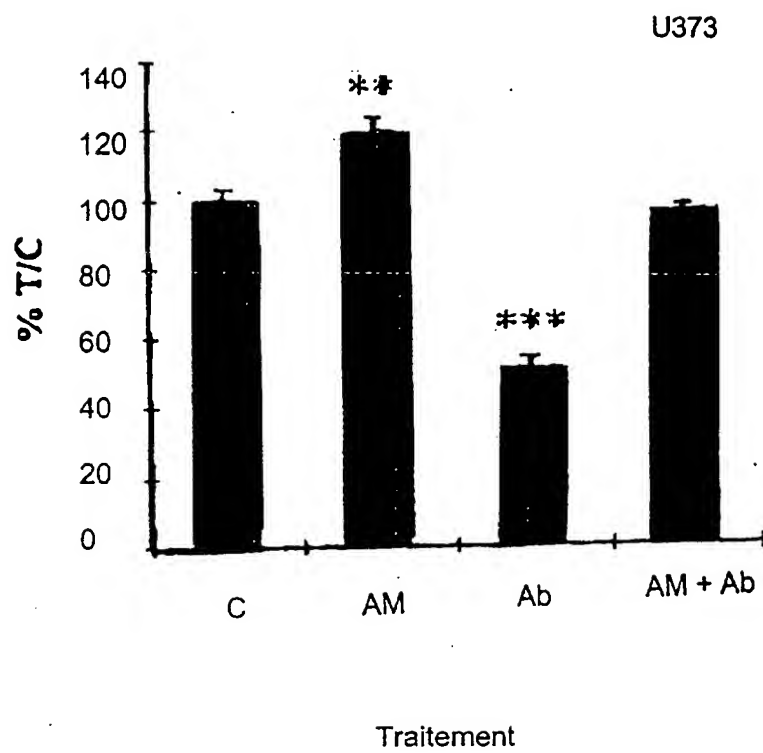


Fig. 5B





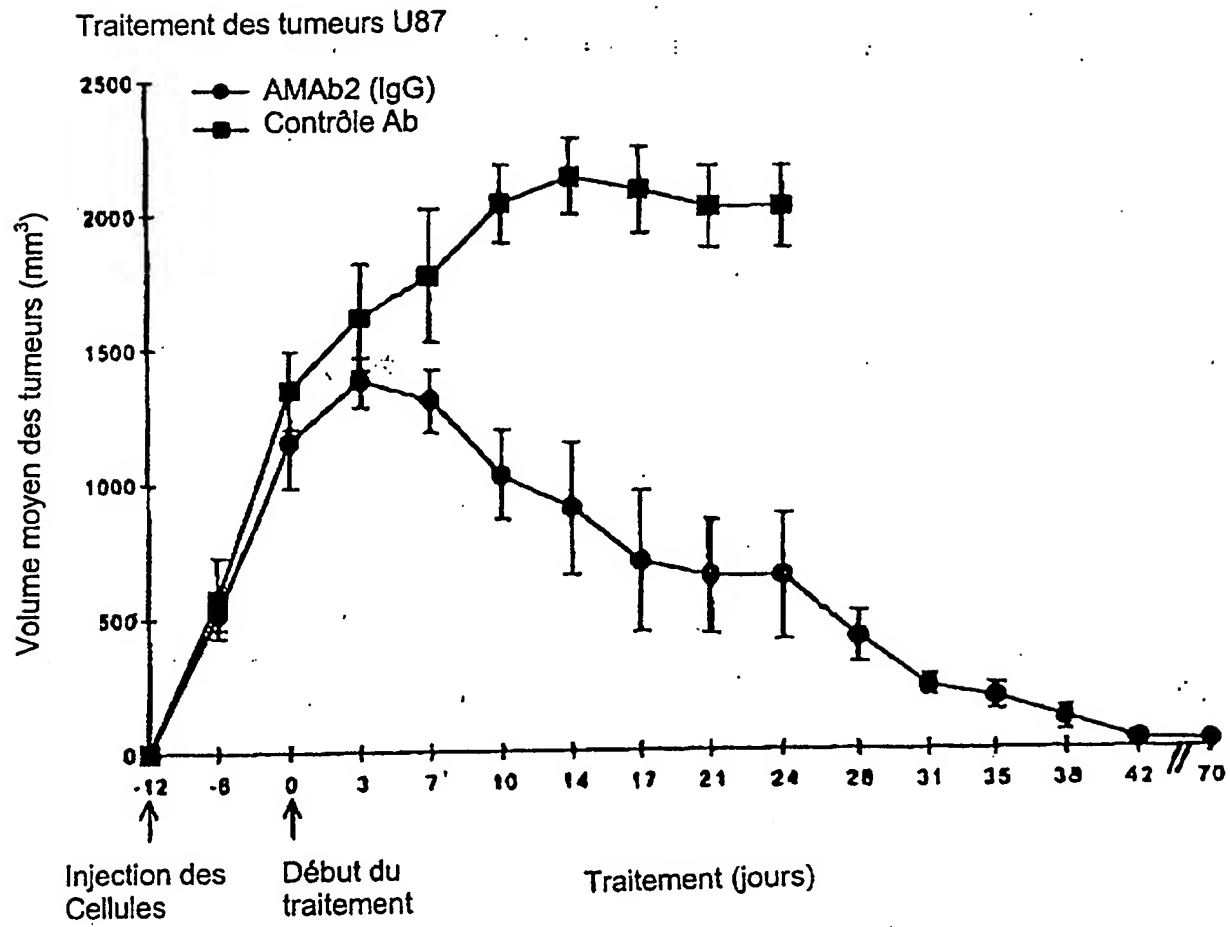


Fig. 6



2821080

# RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 600878  
FR 0102291

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 97 07214 A (UNSWORTH EDWARD J ;MACRI CHARLES (US); US HEALTH (US); CUTTITTA FR) 27 février 1997 (1997-02-27) * revendications 1-16 *	1-15	C07K16/26 A61K39/395 A61P35/00
X	MILLER MAE JEAN ET AL: "Adrenomedullin expression in human tumor cell lines: Its potential role as an autocrine growth factor." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 38, 1996, pages 23345-23351, XP002184272 ISSN: 0021-9258 * le document en entier *	1-15	
X	EP 0 622 458 A (KANGAWA KENJI ;SHIONOGI & CO (JP)) 2 novembre 1994 (1994-11-02) * revendications 45-53 *	1-5	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			C07K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
28 novembre 2001		Le Flao, K	
<p><b>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

1

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0102291 FA 600878**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.  
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 28-11-2001  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9707214	A	27-02-1997	AT	180832 T	15-06-1999
			AU	710662 B2	23-09-1999
			AU	6776596 A	12-03-1997
			CA	2229741 A1	27-02-1997
			DE	69602756 D1	08-07-1999
			DE	69602756 T2	10-02-2000
			EP	0845036 A1	03-06-1998
			JP	11512087 T	19-10-1999
			US	6320022 B1	20-11-2001
			WO	9707214 A1	27-02-1997
EP 0622458	A	02-11-1994	JP	2774769 B2	09-07-1998
			JP	7196693 A	01-08-1995
			AU	678212 B2	22-05-1997
			AU	6064894 A	27-10-1994
			CA	2122112 A1	27-10-1994
			EP	0622458 A2	02-11-1994
			US	5910416 A	08-06-1999
			US	5639855 A	17-06-1997
			US	5837823 A	17-11-1998
			US	5830703 A	03-11-1998